

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift

(10) DE 42 21 836 A 1

(51) Int. Cl. 5:

A 61 K 37/02

C 07 K 15/10

DE 42 21 836 A 1

- (21) Aktenzeichen: P 42 21 836.5
(22) Anmeldetag: 3. 7. 92
(23) Offenlegungstag: 5. 1. 94

(21) Anmelder:

Gabius, Hans Joachim, Prof. Dr., 35041 Marburg, DE;
Bardosi, Attila, Dr.med., 37085 Göttingen, DE

(22) Erfinder:

Antrag auf Nichtnennung

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Das biochemisch aufgereinigte Mistel-Lektin (ML-1) als therapeutisch anwendbarer Immunmodulator

(55) Beschrieben wird eine immunmodulatorisch wirksame pflanzliche Substanz, die aus wäßrigem Mistel-Extrakt biochemisch gewonnen und aufgereinigt wurde. Diese Substanz - sog. (VAA = Viscum album agglutinin; ML-I) - gehört in die Gruppe der Galaktosid-spezifischen Lektine - sog. zuckerbindende Proteine ohne enzymatische Aktivität und Bezug zu Antikörper - die durch ihre spezifische Erkennung von Zuckerketten von Glykokonjugatstrukturen verschiedene physiologische und pathophysiologische zelluläre Vorgänge wie die Tumorentstehung und unspezifische Immunantwort, beeinflussen und steuern können. Das ML-I besteht aus je einer toxischen A-Kette (Molekulargewichte der beiden gefundenen Genprodukte 29,5 kDa, bzw. 27,5 kDa) und einer zuckerbindenden B-Kette (Molekulargewicht 34 kDa) mit folgenden N-terminalen Aminosäure-Sequenzen

Die optimalen Ampulleninhalte sind 75-150 ng/ml ML-I.

1 5 10 15 20
B D D V T S S A S E P T V R I V G R N G M

A₁ Y E R I R L R V T H Q T T G E E Y F R F
A₂ Y E R L R L R V T H Q T T G D E Y F R F I T L L R D Y V

DE 42 21 836 A 1

Aufgrund des Einflusses der Bindung des Lektins an die Zellmembran auf intrazelluläre Biosignalketten wird die Immunmodulation durch die Erhöhung der Sekretion von Zytokinen und anderer immunologische Parameter bemerkbar. Diese Wirkung tritt ausschließlich im Niedrigdosisbereich, d. h. 1-2,5 ng/kg Körpergewicht auf, die die Anwendung des gereinigten ML-I in der Bekämpfung von bösartigen Tumoren, als unterstützende Therapie denkbar macht.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Beschreibung

1. Das biochemisch aufgereinigte Mistel-Lektin (ML-I) als therapeutisch anwendbarer Immunmodulator

5

2. Gebiet: Biochemie, Pharmazie und Medizin

2.1 Bisherige Erkenntnisse

10 Die detaillierte Kenntnis über die Rolle des körpereigenen Abwehrsystems in der Bekämpfung von bösartigen Tumoren ist eine wesentliche Voraussetzung der Ausarbeitung erfolgreicher Therapie-Strategien. Spezifische, gegen Tumorzell-assoziierte Antigene gerichtete Immunreaktionen, die von T-Lymphozyten ausgeführt werden, sowie die nicht-spezifischen Immunreaktionen, für die die natürlichen "Killer" (NK-Zellen) und die Makrophagen verantwortlich sind, sind wesentliche Bestandteile der angeborenen oder erworbenen Resistenz gegen 15 Tumorerkrankungen. Die kontrollierte Stärkung von derartigen Reaktionen durch Immunmodulatoren, wie z. B. pflanzliche Extrakte, können neben den drei bekannten Therapiemöglichkeiten (chirurgischer Eingriff, Chemotherapie, Strahlentherapie) als adjuvante Therapie in der Bekämpfung von malignen Neoplasien auf dem Gebiet der Onkologie wesentlich mitwirken. Daher ist der Bedarf an immunmodulatorischen Substanzen, die wissenschaftlich beweisbare und reproduzierbare Wirkungen bezüglich des körpereigenen Immunsystems besitzen, 20 immer größer geworden.

3. Theoretische Grundlagen

25 Entscheidendes Kriterium für die Beurteilung einer vermeintlich therapeutisch einsetzbaren Substanz, ob sie aus einem breit angelegten Syntheseprogramm oder aus Extraktion von Pflanzenteilen hervorgegangen ist, ist ihr objektivierbarer Erfolg im Rahmen einer gewissenhaften biochemischen, zellbiologischen, immunologischen und klinischen Untersuchung bzw. Prüfung. Voraussetzung dieser Prüfung ist die genaue Kenntnis der stofflichen Eigenschaften der zu bewertenden Substanz, um auszuschließen, daß mögliche Erfolge mit Einzelpräparationen keinen singulären Charakter haben. Dies bedeutet im Falle pflanzlicher Extrakte, daß Aufschluß erhalten 30 werden muß über die Natur der an der Wirkungsauslösung beteiligten Komponenten und ihren effektiv wirksamen Dosierungsbereichen, die in in vitro- und in vivo-Testreihen bestimmt werden müssen. Ausgehend von der Pflanzensubstanz erlaubt diese Kenntnis der aktiven Inhaltsstoffe langfristig, die Extrakthanwendung zu standardisieren und aus ihr hervorgehende Arzneimittel zu entwickeln.

35 Lektine — sog. zuckerbindende Proteine ohne enzymatische Aktivität und ohne strukturellen Bezug zu Antikörpern — spielen eine entscheidende Rolle in der Informationsübertragung zwischen Zellen sowie Zellen und ihrer Umgebung, durch ihre spezifische Erkennung von Glykokonjugatstrukturen (Glykoproteine und Glykolipide). Die im Rahmen dieses Prozesses involvierten Protein-Zucker-Erkennungsprozesse auf der Zelloberfläche können verschiedene physiologische und pathophysiologische zelluläre Vorgänge beeinflussen und steuern. Ein wesentliches Element dieser Erkennung sind die Zuckerketten. Die Sequenzen dieser Molekulketten unterliegen fein regulierten Änderungen im Verlauf der Entwicklung und der Tumorentstehung, so daß sich 40 vermuten läßt, daß sie zur molekularen Definition des gegebenen Zustandes einer Zelle beitragen. Die auf Membranen oder intrazellulär vorhandenen Rezeptoren (sog. endogene Lektine) sind fähig die in der Sequenz der Monosaccharide gespeicherte Information abzulesen. Mit Bezug auf onkologische Fragen ist anzumerken, daß Lektine im Immunsystem und Tumoren vorkommen. Somit ist leicht nachvollziehbar, daß ihre Präsenz auch 45 für Tumordiagnostik und Tumortherapie relevant sein kann.

4. Qualitative und quantitative Analysen

50 Durch die konsequente Verfolgung des o. g. biochemischen Weges wird im folgenden ein Bestandteil von wäßrigen Mistel-Extrakten beschrieben, das galaktosid-spezifische Lektin (ML-I). Das Lektin kann durch seine wissenschaftlich nachgewiesene immunmodulatorische Wirkung für einen möglichen therapeutischen Effekt der Extrakte verantwortlich gemacht werden, wenn es im optimalen Dosisbereich verabreicht wird.

4.1 Die Aufreinigung von ML-I

55

4.1.1 Methodischer Teil

60 100 g getrockneter Misteltee (*Viscum album* VAA) wurde über Nacht in 1000 ml 20 mM Phosphatpuffer (pH7.2) eingeweicht und mechanisch homogenisiert (3 Minuten).

Nach Zentrifugieren wurde der Überstand durch eine mit Laktose als Affinitätsligand besetzte Sepharose 4B-Säule gegeben. Die Aktivierung erfolgt mit Divinylsulfon.

Nach Durchlaufen der Lösung durch die Sepharose-Säule wurde der Säuleninhalt mehrmals gewaschen. Das Lektin wurde durch Anwendung von 400 ml 0.3 M Laktose-Lösung herausgelöst.

Nach der Affinitätschromatographie wurde die Lösung mit Hilfe von Ultrafiltration (Diaflo Ultrafiltration Model 50 mit YM-5 Membran) konzentriert, dialysiert gegen PBS und Wasser und lyophilisiert.

4.2 Molekularbiochemische Eigenschaften des ML-I

4.2.1 Methodischer Teil

In Anwesenheit von 0,1% Natriumdodecylsulfat wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese vorgenommen, um die Komponenten des ML-I zu trennen und die Molekulargewichte zu bestimmen.

5

4.2.2 Ergebnisse (Abb. 1)

Das aufgereinigte ML-I setzt sich aus einem durch eine Disulfidbrücke verbundenen Dimer zusammen, dessen toxischer Bestandteil eine von zwei A-Ketten und zuckerbindender Bestandteil eine B-Kette sind.

10

Das Molekulargewicht der zwei A-Ketten beträgt 29,5 kDa bzw. 27,5 kDa.

Das Molekulargewicht der B-Kette beträgt 34 kDa.

4.3 N-Terminale-Sequenzanalyse des XL-I

15

4.3.1 Methodischer Teil

Die N-Terminale-Sequenzanalyse der beiden A-Ketten und der B-Kette wurde mit dem "gas-phase"-Sequenzierungsmodell 470A mit Kombination von PTH-Analysemödell 120A (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Weitere Peptide wurden von der B-Kette gewonnen nach Bromcyan-Spaltung, danach wurden die Fragmente mit Hilfe von "reversed phase high-performance" Flüssigchromatographie an einer C18-Säule von einander getrennt.

20

4.3.2 Ergebnisse

25

Die Analyse ergab die folgenden Amino-Terminal-Teilsequenzen der zwei toxischen A₁, A₂-Ketten und der immunmodulatorisch wirkenden B-Kette:

	1	5	10	15	20	30																						
B	D	D	V	T	S	A	S	E	P	T	V	R	I	V	G	R	N	G	M									
A ₁	Y	E	R	I	R	L	R	V	T	H	Q	T	T	G	E	E	Y	F	R	F								
A ₂	Y	E	R	L	R	L	R	V	T	H	Q	T	T	G	D	E	Y	F	R	F	I	T	L	L	R	D	Y	V

35

40

Computerisierte Homologieanalyse:

Die Sequenz der beiden A-Ketten ist bis auf zwei Aminosäuren (die 4. und 15. Stelle mit Ladungsneutralen Austauschen) identisch. Es besteht keine Homologie der Aminosäuresequenz zwischen den A-Ketten und der B-Kette, jedoch konnte eine Identität der B-Kette mit den Aminosäuresequenzen des pflanzlichen Ricin D und E im Bereich 12–19 festgestellt werden. Weitere, nicht näher lokalisierte Peptidsequenzen — DVA-QANPKLRRIIIYPATG — zeigten eine Homologie mit der Sequenz des Ricin D, die in der Nähe des Karboxyl-Terminus lokalisiert ist.

45

Keine signifikante Homologie fand sich in einem weiteren Oligopeptid (FVEGERPSS).

50

4.4 Lektin (ML-I)-Bindung zu Zellen

55

4.4.1 Methodischer Teil

4.4.1.1 Chemische Modifizierung des ML-I (Tabelle 1.)

55

In jeder Reaktion wurde 100 µg Lektin chemisch modifiziert mit Zugabe von Reagenzien, die eine Spezifität zu bestimmten Aminosäuregruppen besitzen. Aminogruppen wurden modifiziert mit Hilfe Zitraconsäureanhydrid (pH 8,0). Guanidierung der ε-Amino-Gruppe des Lysins wurde in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer (pH 10,5) in Anwesenheit von 0,6 M O-Methylisourea (im gleichen Volumen, pH 10,5) vorgenommen. Arginin wurde modifiziert mit 50 mM Zyklohexan-1,2-dion in 0,2 M Natriumborat-Puffer (pH 9,0) und mit gepuffertem 20 mM Phenylglyoxal (pH 8,0). Für Tyrosin wurde N-Azetylimidazol in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5); für Tryptophan N-Bromosuccinimid (pH 4,0); für Karboxylgruppen Glycin-Ethylester/Ethyl [3-(Dimethylamino)Propyl]-Karbo-diimid; für Histidin-Gruppen Diethyl-Pyrokarbonat verwendet. Das nach Reaktion überschüssige Reagenz wurde durch Dialyse gegen den Reaktionspuffer bei 4°C entfernt. Die Aktivität des Lektins wurde mit Hilfe von biotinyliertem und laktosyiertem Neoglykoprotein überprüft. Die Ergebnisse belegen, daß Modifizierung der NH₂-Gruppen möglich ist.

60

65

4.4.1.2 Biotinylierung des ML-I

Zum Schutz der Zuckerbindungsstelle des Lektins während der Biotinylierung wurden 100 µg Lektin — gelöst in 8 ml 2 mM Phosphatpuffer, pH 8,0 — 12 Stunden lang gegen 20 mM Laktose-haltigen Puffer dialysiert. Die Biotinylierung wurde mit langsamer Gabe von 3 mg Biotinyl-N-Hydroxysuccinimidester — gelöst in 0,6 ml N,N'-Dimethylformamid — initiiert. Nach 14 Stunden (bei 4°C) wurde das Gemisch gegen 2 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) dialysiert. Die Biotinylierungsgrad beträgt 13 Gruppen/Untereinheit.

Für die weitere Untersuchung wurde das ML-I auf spezifische Zellbindung geprüft. In Zellkultur gezüchtete Zellen (10^7 Zellen/ml) wurden mit 150 ng/ml biotiniertem Lektin 45 Min. lang bei 4°C inkubiert, vorsichtig gewaschen, dann mit 10 µg/ml Fluoreszenz-markiertem Avidin-Komplex 30 Min. nachinkubiert, anschließend mit 2% BSA (Kalbserumalbumin)-haltigem Phosphatpuffer gewaschen. Die positiven Zellen wurden mit Hilfe einer Zytophotometer (Ortho 5H) quantifiziert. Kontrollreaktion in Anwesenheit von Laktose bestätigt die Zuckerabhängigkeit der Bindung. Für die quantitative Analyse der Lektin-Bindung durch die Zelloberfläche benötigte man das biotinierte Lektin sowie das β-Galaktosidase/Streptavidin-Konjugat. Die folgenden zeitabhängigen Untersuchungen wurden durchgeführt, um die maximale Bindungskapazität zu bestimmen:

Die Zellen (5×10^5 Zellen/Assay in 200 µl 0,1% BSA-haltige Hank's-Lösung) wurden 30 Min lang bei 4°C mit 0—15 µg biotiniertem Lektin in der Anwesenheit und Abwesenheit von hemmenden Substanzen (0,3 M Laktose und 1 mg/ml Asialofetuin) inkubiert. Die Zellen wurden dann — nach erneutem Waschen — mit 5 µg/ml β-Galaktosidase/Streptavidin-Konjugat weiter 90 Min. lang bei 4°C inkubiert. Die zellassoziierte Enzymaktivität wurde nach mehrmaligem Waschen mit Chlorophenolrot-β-D-Galakto-Pyranosid gemessen. Aus den Daten wurden die Dissoziationskonstante, das Ausmaß der maximalen Bindungskapazität und der Hill-Koeffizient ermittelt.

4.4.2 In vivo Bioverteilung des ML-I sowie Analyse des Lektin-abhängigen Biosignalling

25

4.4.2.1 Methodischer Teil

Um die Verteilung der zuckerbindenden B-Kette im Versuchstier zu bestimmen, wurde die Radioiodierung mit Chloramin-T verwendet. Fünf Stunden nach der Injektion von 5 µg Radiojod-markiertem Protein ($1 - 2 \times 10^4$ Bq) in den Schwanz einer ddY Maus wurde die Bindung anhand der meßbaren Dosis im prozentuellen Verhältnis zur injizierten Dosis in den Organen bestimmt.

Monozytäre Leukämie-Zellen (THP-1-Zellen) wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS gezüchtet in Anwesenheit von 2 mM L-Glutamin und 5×10^{-5} M β-Merkapto-Ethanol. Um die Wirkung der Lektinbehandlung zu analysieren, wurden die Zellen zweimal mit DMEM-Medium gewaschen und mit unterschiedlichen Konzentrationen vom Lektin inkubiert.

Da der Protein- und Lipidphosphorylierung sowie der intrazellulären Verfügbarkeit von Ca^{2+} -Ionen große Bedeutung für Biosignalketten beigemessen werden, wurden diese Parameter in Abhängigkeit von der Lektinbehandlung gemessen.

40

4.4.2.2 Ergebnisse

Immunmodulatorische und antitumorale Wirkung des ML-I

Durch die Analysen wurden ML-I-Bindungsaktivitäten in der Leber, dem Magen, den Speicheldrüsen sowie in Milz und Thymus nachgewiesen. Die Ansammlung des ML-I in Milz/Thymus deutet auf die immunmodulatorische Kapazität der Substanz hin (Tabelle 2).

Die Untersuchungen mit THP-1-Zellkulturen zeigten eindeutig, daß sich das ML-I an die Tumorzellen bindet. Das Lektin-Bindungsmuster, das durch den "two-step Assay" analysiert wurde, zeigte eine eindeutige Abhängigkeit mit Bezug auf die Lektinkonzentration. Die Tatsache, daß die Bindung bei dieser Konzentration durch Laktose verhindert werden konnte, zeigt, daß es sich hier um eine Zucker-vermittelte Bindung handelt. Der lineare Anteil des "Scatchard plot" erlaubte die Kalkulation des KD mit einem Wert von 800 nM und mit einer maximalen Bindungskapazität von $1,1 \times 10^6$ Lektin-Molekülen pro Zelle. Die zwei Teile des "Scatchard plot" ergab die Hill Koeffizienten von 1,49 und 1,0, wobei positive Kooperativität bei niedriger Lektinkonzentration des ML-I besteht.

Auf die Bindung erfolgte eine quantitative Erhöhung des Einbaues von [³²P]-Phosphat in Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat, jedoch nicht in Phosphatidylcholin oder Phosphatidylethanolamin. Der 32p-Gehalt eines 27 kDa Proteins steigt gleichfalls an. Durch Einsatz eines fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikators konnte eine ca. 25%ige Erhöhung der Konzentration dieses Ionentyps in den Zellen nach Lektinbehandlung gemessen werden. Die Bindung des Lektins vermag es daher, intrazelluläre Biosignalketten zu modulieren. TNF-α-Freisetzung steigt ebenfalls an.

4.5 Therapie-Strategie und Dosierung

Da unterhalb der µg/ml-Konzentration zelluläre Antworten wie lektininduziertes Biosignalling und erhöhte Zytokinfreisetzung meßbar sind, wurde dem Niedrigdosisbereich besonderes Augenmerk gewidmet, was die Resultate im nachhinein rechtfertigen. Positiver Einfluß auf die Zahl der "large granular lymphocytes" und die Phagozytenaktivität der Granulozyten bei Versuchspersonen ist von der Präsenz des Lektins in ng-Mengen abhängig. Bei der Dosis im 1—2,5 ng/kg Körpergewicht-Bereich sowie der wöchentlich zweimaligen Admini-

stration (subkutan oder intravenös) kommt es zu einer Erhöhung der Lymphozytensubpopulationen, wie Pan T-Zellen, "helper/inducer" T-Zellen, NK-Zellen. Darüberhinaus trat eine erhöhte Expression von Interleukin (II)-2-Rezeptoren, denen eine definitive Rolle in der Aktivierung von T-Zellen zugeschrieben wird.

In drei unabhängigen Tiermodellsystemen, dem B16-Melanom, dem RAW 117-H10 Lymphosarkom und dem L1-Fibrosarkom, konnte eine signifikante Reduktion der Metastasierung durch die Gabe vom ML-I Dosen im Bereich von 1–2,5 ng/kg nachgewiesen werden. Bemerkenswert war die deutliche Zunahme der zytotoxischen Kapazität der Milzellen, die Steigerung des Thymusgewichtes sowie der Überlebenszeit. Die histopathologischen Untersuchungen konnten die Reduktion der Tumogröße neben der reduzierten Metastasierung ebenfalls belegen.

In dem hier ermittelten Niedrigdosisbereich – 1–2,5 ng/kg Körpermengen – traten bei den Patienten nur die bekannten Symptome einer Akutphase-Reaktion wie leichtes Fieber, selten Kopfschmerzen und Ermüdbarkeit auf. Allergische oder anaphylaktische Reaktionen konnten nicht beobachtet werden.

Die hier aufgeführten Ergebnisse der in vitro und in vivo Untersuchungen zeigen, daß das ML-I einen quantitativ und qualitativ definierbaren immunmodulatorischen Effekt besitzt, dessen optimale Wirkung in einem bisher im Vergleich zu anderen Immunmodulatoren seltenen Niedrigdosisbereich – ca. 1 ng/kg Körpermengen – liegt.

In Anbetracht der definitiv dosisabhängigen immunmodulatorischen Wirkung sind die optimalen Ampulleninhalte des gereinigten und keimfreien ML-I 75, 100, bzw. 150 ng/ml, aufgelöst im sterilen Aqua bidest. in Anwesenheit des Schutzproteins, Humanalbumin (100–250 µg/ml).

5. Standardisierung des ML-I-Gehaltes kommerziell verfügbarer Mistelextrakte

Aufgrund des o. g. ermittelten optimalen Dosisbereiches ist die Standardisierung des Lektingehaltes kommerziell verfügbarer Mistelextrakte für die immunmodulatorische Wirkung dieser Präparate eine unerlässliche Voraussetzung.

5.1 Biochemische Standardisierung des ML-I-Gehaltes von Mistelpräparaten

Mit Hilfe von Antikörpern gegen das Lektin (polyklonal oder monoklonal) und einen Liganden für das Lektin (Glykoprotein wie Asialofetuin oder laktosyliertes Albumin) wird der Gehalt an aktivem Lektin in einem 3-Schritt-Testverfahren bestimmt. Dieses folgt gängigen Rezepten, wobei nur besondere, für diesen Zweck produzierte Reagenzien gebraucht werden. Zuerst wird der Ligand an die Innenwandung von ELISA-Platten wells immobilisiert (gängige ELISA-Platten wie Polyssorb etc.). Nun wird mit lektinhaltiger Lösung inkubiert und aktives Lektin bindet an den Liganden. Nach gründlichem Waschen wird das an den Liganden gebundene Lektin den Antikörper binden. Mit kommerziellen Antikörernnachweis-Reaktion, z. B. Konjugat von Protein A – oder zweiten Antikörper-Enzym, wird jetzt der Gehalt an gebundenem Antikörper und damit Lektin relativ zu einer Eichkurve ermittelt.

Da die Immunmodulation von Aspekten des körpereigenen Abwehrsystems zu antitumoralem Effekten im Versuchstier führte, ist eine adjuvante Anwendung – als Ergänzung und Unterstützung der bekannten Behandlungsmethoden, wie Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie – in der Bekämpfung von bösartigen Tumoren von potentieller Bedeutung.

Patentansprüche

1. Das aus wäßrigem Mistel-Extrakt biochemisch aufgereinigte Galaktosid-spezifische Lektin – genannt ML-I – dadurch gekennzeichnet, daß es aus Proteinketten besteht, von denen eine für die immunmodulatorische Wirkung durch den Einfluß auf die intra- und interzellulären Biosignalketten verantwortlich ist, diese Wirkung in vivo nur in einer Niedrigdosis im Nanogrammbereich durch die Erhöhung der Zytokinsekretion und anderer zellulärer immunologischer Parameter erreichbar ist, und aufgrund derer eine unterstützende – palliative – Therapie in der Onkologie Anwendung finden kann.

2. Das ML-I nach Schutzanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einem durch Disulfidbrücken verbundenen Dimer besteht, dessen toxischer Bestandteil je eine von zwei A-Ketten mit einem Molekulargewicht von 29,5 kDa, bzw. 27,5 kDa, und dessen immunmodulatorisch wirkender, zuckerbindender Bestandteil, die B-Kette, ein Molekulargewicht von 34 kDa besitzt.

3. Das ML-I nach Schutzansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Ketten die folgenden Amino-Terminale-Teilsequenzen besitzen:

1	5	10	15	20
B	D D V T S S A S E P T V R I V G R N G M			

A₁ Y E R I R L R V T H Q T T G E E Y F R F

A₂ Y E R L R L R V T H Q T T G D E Y F R F I T L L R D Y V

4. Das ML-I nach Schutzansprüchen 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette weitere, nicht näher lokalisierte Peptidsequenzen DVAQANPKLRRIIYPATG und FVEGERPSS besitzt.
5. Das ML-I nach Schutzansprüchen 1, 2, 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Substanz eine definitive immunmodulatorische Wirkung zugeschrieben werden kann. Der Einfluß auf die Biosignalketten ist durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Verfügbarkeit und des Einbaues von [32p]-Phosphat in definierte Phospholipide und in definierte Proteine in Kulturen der menschlichen Linie THP-1, durch die Erhöhung der Sekretion von Interleukin-6, zahlenmäßige Vermehrung der Pan T-Zellen, "helper/inducer" T-Zellen, natürlicher "Killer"- (NK)-Zellen, der "large granular lymphocytes" (LGL) sowie Zunahme der Phagozytentaktivität der Granulozyten und erhöhte Produktion von Tumornekrosefaktor- α in vivo belegt.
10. 6. Das ML-I nach Schutzansprüchen 1, 2, 3, 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die in vivo und in vitro Studien quantitativ und qualitativ belegbare, optimale immunmodulatorische Wirkung ausschließlich im Niedrigdosisbereich, d. h. 1 – 2,5 ng/kg Körpergewicht, auftritt, die eine Anwendung des biochemisch aufgereinigten ML-I als unterstützende Therapie in der Bekämpfung von bösartigen Tumoren denkbar macht. Die optimale Frequenz der therapeutischen Anwendung ist zweimal wöchentlich (Montag – Donnerstag, oder Dienstag – Freitag).
15. 7. Das ML-I nach Schutzansprüchen 1, 2, 3, 4, 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß die optimalen Ampulleninhalte des biochemisch gereinigten und keimfreien ML-I, 50 – 150 ng/ml ML-I, aufgelöst im sterilen Aquadest oder PBS mit oder ohne 100 – 250 µg Albumin sind.
20. 8. Das ML-I nach Schutzansprüchen 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß aufgrund des optimalen Dosisbereiches die Standardisierung des Lektингehaltes kommerziell verfügbarer Mistelextrakte für die immunmodulatorische Wirkung dieser Präparate eine unerlässliche Voraussetzung ist. Die Standardisierung erfolgt mit Hilfe von Antikörpern gegen das Lektin (polyklonal oder monoklonal) und einen Liganden für das Lektin (Glykoprotein wie Asialofetuin oder laktosyliertes Albumin) in einem 3-Schritt-Testverfahren (ELISA). Der Gehalt wird anhand der Konzentration von gebundenem Antikörper und damit Lektin relativ zu einer Eichkurve ermittelt.

Tabelle 1

Chemische Modifizierung des galaktosid-spezifischen Mistellektins

	Modifizierung durch	Modifizierte Aminosäure	Bindungsaffinität zu Lac-BSA-Biotin
30	ZA	Lysin	(10%) reduziert
35	OMI	Lysin	unverändert
	CHD	Arginin	(29%) reduziert
40	PHG	Arginin	(5%) reduziert
	NAI	Tyrosin	(40%) reduziert
45	CDI/GME	Carboxylgruppen	unverändert
	DEPC	Histidin	(30%) reduziert

50. ZA: Zitraconsäureanhydrid; OMI: O-Methylisoharnstoff; CHD: 1,2-Cyclohexandion; PHG: Phenylglyoxal; NAI: N-Acetylimidazol; NBS: N-Bromsuccinimid; CDI Carbodiimid; GME Glycinmethylester; DEPC: Diethylpyrocarbonat.

55

60

65

Tabelle 2

Bioverteilung von ^{125}I -markiertem Lektin in Ehrlich-Tumor-tragenden Mäusen 5 Stunden nach Injektion

Gewebetyp	B-Kette (Mistellektin)	
Blut	0,89 \pm 0,06	5
Leber	4,77 \pm 0,29	
Niere	1,60 \pm 0,02	10
Milz	2,83 \pm 0,29	
Herz	1,01 \pm 0,05	
Lunge	1,44 \pm 0,14	
Pankreas	0,47 \pm 0,04	
Magen	2,55 \pm 0,22	15
Darm	0,62 \pm 0,09	
Thymus	0,55 \pm 0,11	
Knochenmark	0,14 \pm 0,03	
Hoden	0,44 \pm 0,03	
Speichel	5,52 \pm 0,85	20
Muskel	0,41 \pm 0,02	
Tumor	0,75 \pm 0,06	

Durchschnittswerte \pm SD von 5 Tieren sind angegeben als prozentualer Anteil der injizierten Dosis/g Gewebe nach Injektion von 5 $\mu\text{g}/\text{Tier}$. 25Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

30

35

40

45

50

55

60

65

BEST AVAILABLE COPY